

106

Circular Técnica

Porto Velho, RO
Abril, 2009

Autores

Maurício Reginaldo Alves dos Santos
Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em
Biologia celular – Cultura de tecidos
vegetais, pesquisador da Embrapa
Rondônia, Porto Velho, RO,
mauricio@cpafro.embrapa.com.br

Maria das Graças Rodrigues Ferreira
Engenheira Agrônoma, D.Sc. em
Produção vegetal, pesquisadora da
Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO,
mgraca@cpafro.embrapa.com.br

Arêssa Oliveira Correia
Bióloga, Mestranda em
Desenvolvimento Regional e Meio
Ambiente na Universidade Federal de
Rondônia - UNIR, Porto Velho, RO,
aressa_oliveira@yahoo.com.br

Josilene Félix Rocha
Graduanda em Ciências Biológicas na
Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO,
josifelixrocha@yahoo.com.br



Indução da germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Musa velutina*

Introdução

Atualmente, a criação de híbridos interespecíficos representa uma possibilidade altamente desejável em relação às flores e plantas ornamentais, considerando-se que o surgimento de novos materiais com potencial ornamental é um importante mobilizador do mercado destes produtos.

Porém, a obtenção de híbridos interespecíficos é dificultada por barreiras pré-zigóticas (como incompatibilidade entre grãos de pólen e estigmas, crescimento lento do tubo polínico, estilete muito longo, abscisão precoce da flor, etc) ou pós-zigóticas (a fertilização ocorre, mas o embrião híbrido é abortado, devido à degeneração ou desenvolvimento anormal do endosperma).

A polinização *in vitro* tem sido utilizada no resgate de híbridos raros, cujos mecanismos de incompatibilidade impedem a hibridação natural entre espécies. Esta técnica envolve a cultura de óvulos isolados ou contendo a placenta, nos quais são depositados os grãos de pólen, em germinação ou não. Esta íntima associação elimina barreiras de incompatibilidade que possam estar no estigma, estilete ou ovário. Sendo assim, os gametas masculino e feminino combinam-se para produzir o zigoto, desenvolvendo-se posteriormente em embrião.

Portanto, o desenvolvimento de protocolos para a fertilização *in vitro* apresenta-se como uma ferramenta de grande importância para subsidiar trabalhos de melhoramento.

A bananeira ornamental (*Musa velutina* H. Wendl. & Drude), também conhecida como bananeira de jardim, é uma espécie da família Musaceae. É um arbusto perene, de textura herbácea, de porte ereto, que forma touceiras, rizomatosas, de folhas largas verdes brilhantes, lisas com pecíolos longos, com uso ornamental. Sua inflorescência é ereta, curta, disposta no ápice do pseudocaule, com brácteas róseas também de uso ornamental. Seu cacho é ereto e exótico, com bananinhas rosadas, bastante valorizadas na confecção de arranjos florais.

O objetivo deste trabalho foi determinar os meios de cultura mais adequados para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, considerando a ausência de trabalhos na literatura científica abordando este tema. Estudos realizados com outras espécies mencionam a utilização de pH 6,5, concentrações de sacarose de 20 a 300 g.L⁻¹, ácido bórico de 50 a 200 mg.L⁻¹ e nitrato de cálcio de 300 a 2.000 mg.L⁻¹ para grãos de pólen de maracujazeiro (SILVA et al., 1999); 0 a 200 g.L⁻¹ de sacarose, 200 mg.L⁻¹ de ácido bórico, 800 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio e pH de 3,5 a 6,5 para grãos de pólen de citros (SALLES et al., 2006); 100 g.L⁻¹ de sacarose e 100 mg.L⁻¹ de ácido bórico para grãos de pólen de tomateiro (Silva et al., 2000); e 0 a 50 g.L⁻¹ de sacarose e 0 a 40 mg.L⁻¹ para grãos de pólen de macieira (DANTAS et al., 2005).

Material e métodos

Foram coletados grãos de pólen de flores de *M. velutina*, no momento da antese, a partir de plantas cultivadas na Embrapa Rondônia, em Porto Velho. Estes grãos de pólen foram imediatamente inoculados em placas de Petri contendo 10,0 mL de meio de cultivo sólido, contendo ágar a 8,0 % e concentrações variáveis de sacarose, ácido bórico e nitrato de cálcio e com diferentes níveis de pH. A incubação foi feita a 24 ± 1 °C, no escuro, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia. Foram conduzidos quatro ensaios, variando-se o pH e as concentrações dos componentes do meio de cultura, conforme demonstrado nas Tabelas 1 a 4.

Tabela 1. Ensaio 1 - meios de cultivo utilizados para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, variando o pH do meio.

Reagentes	Concentrações
Agar (%)	8,0
Sacarose (g ⁻¹)	100,0
H ₃ BO ₃ (mg ⁻¹)	200,0
Ca (NO ₃) . 4 H ₂ O (mg ⁻¹)	600,0
pH	4,0; 5,0; 6,0 e 7,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2. Ensaio 2 - meios de cultivo utilizados para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, variando a concentração de sacarose do meio.

Reagentes	Concentrações
Agar (%)	8,0
Sacarose (g ⁻¹)	0,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 200,0
H ₃ BO ₃ (mg ⁻¹)	200,0
Ca (NO ₃) . 4 H ₂ O (mg ⁻¹)	600,0
pH	6,0*

* pH que resultou em maior porcentagem de germinação no ensaio 1.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3. Ensaio 3 - meios de cultivo utilizados para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, variando a concentração de ácido bórico do meio.

Reagentes	Concentrações
Agar (%)	8,0
Sacarose (g ⁻¹)	50,0*
H ₃ BO ₃ (mg ⁻¹)	0,0; 100,0; 200,0; 300,0 e 400,0
Ca (NO ₃) . 4 H ₂ O (mg ⁻¹)	600,0
pH	6,0

* Concentração de sacarose que resultou em maior porcentagem de germinação no ensaio 2.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4. Ensaio 4 - meios de cultivo utilizados para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, variando a concentração de nitrato de cálcio do meio.

Reagentes	Concentrações
Agar (%)	8,0
Sacarose (g ⁻¹)	50,0
H ₃ BO ₃ (mg ⁻¹)	300,0*
Ca (NO ₃) . 4 H ₂ O (mg ⁻¹)	0,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1000,0
pH	6,0

* Concentração de ácido bórico que resultou em maior porcentagem de germinação no ensaio 3.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com auxílio de uma lupa (80x), foram feitas observações da germinação *in vitro* dos grãos de pólen, de hora em hora, até 12 horas. A partir de então, começou a ocorrer degeneração dos tubos polínicos, observando-se a perda da integridade destas estruturas.

Todos os ensaios foram realizados com quatro repetições (placas de Petri), em delineamento

inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental composta por 100 grãos de pólen em cada placa. Os resultados obtidos em cada ensaio foram submetidos à análise de regressão.

Resultados e discussão

A germinação dos grãos de pólen de *M. velutina* foi gradualmente aumentada, do ensaio 1 ao 4, com a adequação crescente das condições de cultivo. Nas Fig. 1 a 4 estão apresentados os resultados referentes à germinação dos grãos de pólen de *M. velutina* em relação aos meios descritos nas Tabelas 1 a 4.

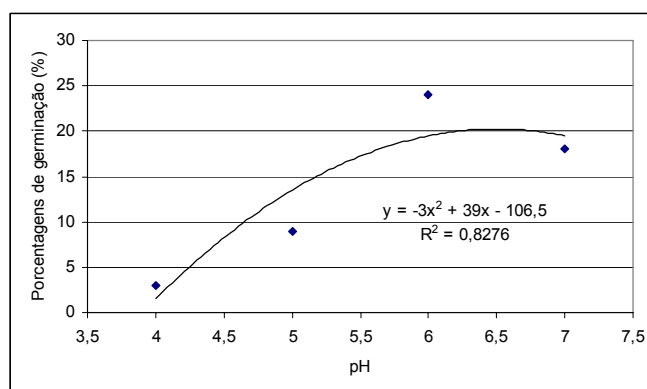


Fig. 1. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, em diferentes pH no meio de cultura, após 12 horas de cultivo.

Letras diferentes indicam significância pelo teste de Tukey, a 5 %. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O pH teve efeito considerável sobre a germinação dos grãos de pólen. O pH 6,0 apresentou porcentagem de germinação de 24 %, enquanto que, nos pH 7,0, 5,0 e 4,0 foram observadas porcentagens de germinação de 18%, 9% e 3%, respectivamente. Estes resultados são similares aos obtidos por Salles et al. (2006), que testaram a germinação de grãos de pólen de três variedades de citros em pH 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5, obtendo a maior porcentagem de germinação, em torno de 12 %, com pH 6,5.

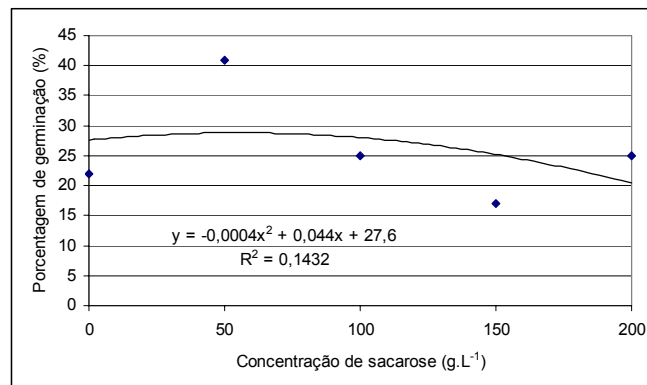


Fig. 2. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, após 12 horas de cultivo.

Letras diferentes indicam significância pelo teste de Tukey, a 5 %. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Utilizando o pH 6,0 (que resultou em maior germinação no primeiro ensaio), foram então testadas cinco concentrações de sacarose. Obteve-se maior porcentagem de germinação na concentração de 50 mg/L (41 %), enquanto que, nas concentrações de 100 mg/L, 150 mg/L e 200 mg/L obteve-se 25 %, 17 % e 25 % de germinação, respectivamente. Quando não se utilizou sacarose no meio, obteve-se 22 %. O mesmo foi observado por Silva et al. (1999), que testaram a germinação de grãos de pólen de maracujá em concentrações de sacarose de 12,5 g.L⁻¹ a 300 g.L⁻¹, e obtiveram a maior germinação, em torno de 47 %, com a utilização de 50 g.L⁻¹ de sacarose. Resultados diferentes foram obtidos por Dantas et al. (2005), que utilizaram concentrações entre 0 g.L⁻¹ e 500 g.L⁻¹ de sacarose na germinação de grãos de pólen de macieira, observando maior germinação na faixa entre 150 g.L⁻¹ e 250 g.L⁻¹.

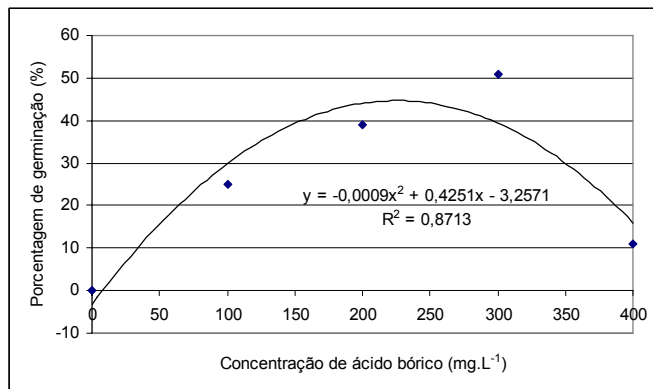


Fig. 3. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, em diferentes concentrações de ácido bórico no meio de cultura, após 12 horas de cultivo.

Letras diferentes indicam significância pelo teste de Tukey, a 5 %. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008.
Fonte: Elaborado pelo autor.

No terceiro ensaio, observou-se o efeito de concentrações de ácido bórico na germinação de grãos de pólen. A germinação foi crescente, a partir da ausência de ácido bórico, onde não se observou germinação, até atingir 51 % na concentração de 300 mg/L. Nas concentrações intermediárias, de 100 mg/L e 200 mg/L, obteve-se 25 % e 39 % de germinação. A concentração de 400 mg/L de ácido bórico resultou em apenas 11 % de germinação. Estes resultados diferem um pouco dos obtidos por Silva et al. (1999), que utilizaram concentrações de 50 mg.L⁻¹ a 200 mg.L⁻¹ de ácido bórico na germinação de grãos de pólen de maracujazeiro, observando a maior germinação com a concentração de 200 mg.L⁻¹. Pio et al. (2004), avaliando a germinação de grãos de pólen de três variedades de citros, também obtiveram maiores porcentagens de germinação de grãos de pólen de citros com a concentração de 200 mg.L⁻¹ de ácido bórico, para duas variedades, e na ausência deste,

para uma das variedades. No trabalho de Dantas et al. (2005), a ausência ou presença de ácido bórico, a 40 mg.L⁻¹ no meio não afetou a germinação de grãos de pólen de macieira.

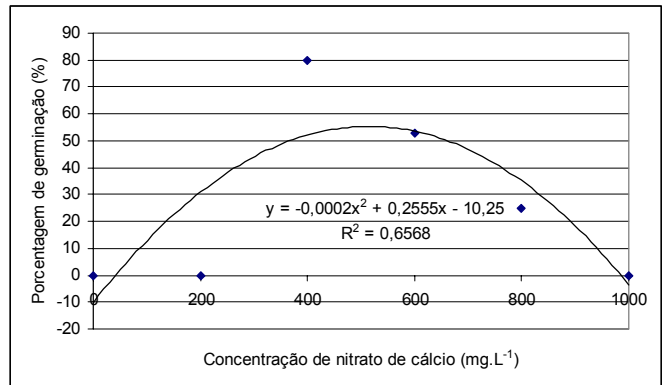


Fig. 4. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, em diferentes concentrações de nitrato de cálcio no meio de cultura, após 12 horas de cultivo.

Letras diferentes indicam significância pelo teste de Tukey, a 5 %. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação às concentrações de nitrato de cálcio testadas, observou-se maior germinação (80 %) com 400 mg/L. Acima disso, as porcentagens diminuíram gradualmente, com 600 mg/L, 800 mg/L e 1000 mg/L, nas quais obteve-se 53 %, 25 % e 0 % de germinação, respectivamente. No tratamento onde não se utilizou nitrato de cálcio, ou com apenas 200 mg/L deste, não se observou germinação dos grãos de pólen. Estes resultados diferem dos obtidos por Pio et al., que avaliaram a suplementação do meio com 400 mg.L⁻¹ a 1.400 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio e obtiveram maior porcentagem de germinação de grãos de pólen de citros com a utilização de 800 mg.L⁻¹. Diferentes também são os resultados obtidos por Silva et al. (1999), que avaliaram concentrações de 300 mg.L⁻¹ a 2.000 mg.L⁻¹ deste composto, obtendo maior germinação com 1.000 mg.L⁻¹.

Avaliando os quatro ensaios conjuntamente, observa-se que a maior porcentagem de germinação obtida foi de 80 %. Esta porcentagem foi obtida com a combinação do pH 6,0 com a suplementação do meio com 50 g.L⁻¹ de sacarose, 300 mg.L⁻¹ de ácido bórico e 400 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio.

De acordo com estudos realizados com outras espécies, sabe-se que os grãos de pólen binucleados apresentam maiores porcentagens de germinação *in vitro*. Assim, se os grãos de pólen de *M. velutina* forem trinucleados no momento de antese, talvez seja uma proposta interessante para futuras pesquisas a coleta dos mesmos em fases anteriores do seu desenvolvimento, quando ainda seriam binucleados.

Conclusões

O pH mais adequado para a germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina* é em torno de 6,0.

A concentração de 50 g.L⁻¹ de sacarose estimula a germinação dos grãos de pólen.

A adição de ácido bórico é indispensável para a germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, sendo mais eficiente em torno da concentração de 300 mg.L⁻¹.

A suplementação do meio de cultivo com nitrato de cálcio, a partir de 200 mg.L⁻¹ estimula a germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, sendo que o aumento da concentração, acima de 400 mg.L⁻¹, interfere negativamente na taxa de germinação.

A combinação do pH 6,0 com 50 g.L⁻¹ de sacarose, 300 mg.L⁻¹ de ácido bórico e 400 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio resulta em 80 % de germinação.

O conhecimento dos procedimentos básicos para manipulação do material vegetal envolvido na fertilização *in vitro* será uma ferramenta fundamental na promoção de futuros trabalhos sobre fertilizações interespecíficas no gênero *Musa*.

Referências

DANTAS, A.C.M.; PEIXOTO, M.L.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 27, n. 3, p. 356-359, 2005.

FRITSCH NETO, R.; PEREIRA, A.S.; RASEIRA, M.C.B.; SILVA, G.O.; VELCI, Q.S. Métodos de avaliação de pólen e influência do ácido giberélico em cruzamentos de batata. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 469-473, 2008.

LORENZI, H.; MELO FILHO, L.E. *As plantas tropicais de R. Burble Marx*. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2001. 488 p.

LUZ, C.L.; SCHUELTER, A.R.; LUZ, C.L.; DAL'MASO, A.; VIEIRA, E.S.N.; BARRETO, R.R. Germinação *in vitro* de grãos de pólen e efeito da proteção das plantas na frutificação de cubiu (*Solunum sessiliflorum* Dunal). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 539-545, 2008.

MAIRON, M.S.; BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.; CRUZ, C.D. Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.34, n.3, 1999.

PIO, L.A.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M.; RAMOS, J.D.; ARAÚJO, A.G. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 293-296, 2004.

SALLES, L.A.; RAMOS, D.J.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K.P.; SILVA, A.B. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.

SILVA, A.C.T.F.; LEITE, I.C.; BRAZ, L.T. Avaliação da viabilidade do pólen como possível indicativo de tolerância a altas temperaturas em genótipos de tomateiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 156-165, 2000.

SILVA, M.M.; BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.; CRUZ, C.D. Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 34, n. 3, p. 347-352, 1999.

Circular Técnica, 106

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Rondônia
BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406,
CEP 78900-970, Porto velho, RO.
Fone: (69)3901-2510, 3225-9384/9387
Telefax: (69)3222-0409
www.cpafrro.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2009): 100 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Cléberson de Freitas Fernandes
Secretária: Marly de Souza Medeiros
Membros: Abadio Hermes Vieira
André Rostand Ramalho
Luciana Gatto Brito
Michelliny de Matos Bentes-Gama
Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Expediente

Normalização: Daniela Maciel
Revisão de texto: Wilma Inês de França Araújo
Editoração eletrônica: Marly de Souza Medeiros